



## 宋厚辉

浙江农林大学动物科技学院·动物医学院院长，教授，博士生导师。教育部动物医学类专业教学指导委员会委员，浙江省万人计划科技创新领军人才，浙江省中青年学科带头人，浙江省151人才工程第一层次培养人才，澳大利亚默多克大学兼职教授。从事消化道微生物和食源性病原微生物致病机理以及动物性食品安全研究。已发表学术论文90余篇，获国家科技进步二等奖1项，浙江省科学技术奖二等奖1项。Foodborne Pathogens & Disease 期刊编委。

# 基于纳米颗粒的赭曲霉毒素 A 高灵敏酶联免疫检测方法的建立及应用

章先<sup>1, 2, 3\*</sup> 何珂<sup>1, 2, 3\*</sup> 黄志伟<sup>1</sup> 单颖<sup>4</sup> 曹统<sup>5</sup> 谢琿<sup>5</sup>

宋厚辉<sup>1, 2, 3\*</sup>

① 浙江农林大学动物科技学院 动物医学院 浙江 临安 311300

② 浙江省畜禽绿色生态健康养殖应用技术研究重点实验室 浙江 临安 311300

③ 动物健康检测互联网技术浙江省工程实验室 浙江 临安 311300

④ 浙江大学动物科学学院 浙江 杭州 310058

⑤ 浙江省医学科学院 浙江 杭州 310015

**摘要:** 赭曲霉毒素 (ochratoxins) 主要是由青霉菌 *Penicillium* 和曲霉菌 *Aspergillus* 产生的有毒次级代谢产物，常见于发霉或发酵的农产品中，其中赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA) 毒性最强且最为普遍。OTA 是粮食作物和饲料的重要污染物，在加工、储存或运输过程中均可产生，具有肾毒性和免疫毒性，可通过蓄积作用发挥毒性效应，对人类和动物健康造成严重威胁。本研究通过将 OTA 单克隆抗体包被于纳米磁珠 (magnetic nanoparticles, MNPs) 表面，获得具有免疫活性的磁珠抗体复合物 (MNPs-Anti OTA)，并制备生物素标记的偶联抗原 OTA-BSA-Bio，后续采用链酶亲和素标记的纳米金颗粒 (Strep-HRP-AuNPs) 催化底物进行信号检测，最终建立了 OTA 高灵敏检测方法 (MNPs-bs-AuNPs-ELISA)。在最优条件下，经计算该方法检测下限 (IC<sub>10</sub>) 为 0.01ng/mL，检测区间 (IC<sub>20</sub>-IC<sub>80</sub>) 为 0.02-0.73ng/mL，半数抑制率 (IC<sub>50</sub>)

基金项目：浙江省自然科学基金 (LQ17C170002)；浙江农林大学人才项目 (2016FR025)；浙江农林大学学生科研训练项目 (118-2013200166)；浙江省重点研发计划 (2018C02041)

Supported by Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LQ17C170002), Zhejiang A & F University Talent Initiative Project (2016FR025), Research and Training Program for Students of Zhejiang A & F University (118-2013200166), and Key Research and Development Project Funds of Zhejiang Provincial Science and Technology Department (2018C02041).

\* Corresponding author. E-mail: songhh@zafu.edu.cn

† Contributed equally to this article.

Received: 2019-09-23, accepted: 2019-10-28

为 0.13ng/mL。与 OTA 类似物 OTB、OTC 交叉反应性为 4.3%和 8.1%，对其他常见真菌毒素 AFB<sub>1</sub>、ZEN、FB<sub>1</sub>、DON、CIT 和 PAT 均无交叉反应。玉米、面粉和大豆样本中的加标回收率可达 85.6%–115.7%，对天然样本中 OTA 含量的检测结果表明，该方法与 LC-MS/MS 相关性良好。本研究建立的 MNPs-bs-AuNPs-ELISA 可满足谷物及饲料样本中 OTA 的快速、高灵敏度定量检测，成本较低，具有很好的应用前景。

**关键词：**赭曲霉毒素 A，纳米磁珠，纳米金，生物素-亲和素系统，定量检测

[引用本文] 章先, 何珂, 黄志伟, 单颖, 曹统, 谢琿, 宋厚辉, 2020. 基于纳米颗粒的赭曲霉毒素 A 高灵敏酶联免疫检测方法的建立及应用. 菌物学报, 39(3): 599-609

Zhang X, He K, Huang ZW, Shan Y, Cao T, Xie H, Song HH, 2020. Nanoparticle-based enzyme-linked immunosorbent assay for the sensitive detection of ochratoxin A. *Mycosystema*, 39(3): 599-609

## Nanoparticle-based enzyme-linked immunosorbent assay for the sensitive detection of ochratoxin A

ZHANG Xian<sup>1,2,3,3✉</sup> HE Ke<sup>1,2,3,3✉</sup> HUANG Zhi-Wei<sup>1</sup> SHAN Ying<sup>4</sup> CAO Tong<sup>5</sup> XIE Hui<sup>5</sup> SONG Hou-Hui<sup>1,2,3,3✉</sup>

① College of Animal Science and Technology, College of Veterinary Medicine, Zhejiang A & F University, Lin'an, Zhejiang 311300, China

② Key Laboratory of Applied Technology on Green-Eco-Healthy Animal Husbandry of Zhejiang Province, Lin'an, Zhejiang 311300, China

③ Zhejiang Provincial Engineering Laboratory for Animal Health Inspection and Internet Technology, Lin'an, Zhejiang 311300, China

④ College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China

⑤ Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou, Zhejiang 310015, China

**Abstract:** Ochratoxin A (OTA), a secondary metabolite produced by species of *Aspergillus* and *Penicillium* with multiple toxicity such as nephrotoxicity, teratogenicity and immunotoxicity, is gaining more and more attention worldwide. A detection technique possessing high sensitivity that would be operable with ease is preferred for determination of OTA levels in foods and feeds. In this study, a rapid and sensitive magnetic nanoparticle-biotin-streptavidin-Au nanoparticles-enzyme linked immunosorbent assay (MNPs-bs-AuNPs-ELISA) was prototyped and used for detection of OTA. The result proved that biotin-streptavidin enhanced the detection signal and thereby improved the sensitivity of the assay. The lower limit of detection by using MNPs-bs-AuNPs-ELISA was 0.01ng/mL while the IC<sub>50</sub> was 0.13ng/mL. The detectable range was 0.02–0.73ng/mL. Cross-reactivities to OTA analogues, ochratoxin B and ochratoxin C, were 4.3% and 8.1%, respectively. No cross-reactivity (<0.01%) was observed to other co-occurring mycotoxins (AFB<sub>1</sub>, ZEN, FB<sub>1</sub>, DON, CIT and PAT). The recovery rates in spiked samples of corn, wheat and soybean ranged 85.6%–115.7%, and the intra-day and inter-day relative standard deviations were <10%. Simultaneous analysis of commercially obtained samples (corn, wheat, and feedstuff) showed a good correlation between MNPs-bs-AuNPs-ELISA and liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS-MS). This new method can be used as a sensitive, simple and cost-effective assay to quantify the levels of OTA in cereal and feed samples.

**Key words:** ochratoxin A, magnetic nanoparticles, Au nanoparticles, biotin-streptavidin system, quantitative detection

真菌毒素 (mycotoxin) 为真菌产生的一类有毒次级代谢产物, 在食品安全领域中又称霉菌毒素。已发现的 400 多种真菌毒素, 大部分具有致癌、致畸和致突变等作用, 均可对动物和人类健康造成严重威胁 (Sorrenti *et al.* 2013)。赭曲霉毒素 (ochratoxins) 主要由青霉菌 *Penicillium* 和曲霉菌 *Aspergillus* 产生, 广泛存在于粮食和饲料中, 包含多种结构类似的异香豆素和 L-苯丙氨酸衍生物, 如赭曲霉毒素 A (OTA)、赭曲霉毒素 B (OTB) 和赭曲霉毒素 C (OTC) 等, 其中毒性最强、最为普遍且受关注度最高的为 OTA。OTA 主要发现于谷物中, 也可污染饲料、干果等农作物, 可经人或动物采食被污染的食物进入机体, 靶器官为肾脏, 通过直接或蓄积作用, 引起急性和慢性中毒, 也可二次污染牛奶等动物源性食品 (Brennan *et al.* 2017)。由于具有强烈的遗传毒性和免疫毒性, OTA 已被国际癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 列为人类潜在的致癌物质即 group B 类 (II B) 致癌物 (章先 2016)。

目前 OTA 检测方法主要包括仪器法和免疫分析法 (Zheng *et al.* 2006)。高效液相色谱法 (HPLC)、气相色谱法 (GC) 和液相色谱串联质谱 (LC-MS/MS) 等仪器法在具有良好准确度和重现性的同时, 由于对操作人员和设备要求较高, 同时样品预处理流程较为繁琐且耗时长, 在一定程度上限制了其在基层的推广应用 (章先等 2018)。相比而言基于抗原抗体间特异性反应的免疫分析法如酶联免疫检测法、免疫层析检测法和芯片检测法等, 由于具有灵敏度高、特异性好等诸多优势, 近年来发展迅速。在免疫分析检测领域, 特别是酶联免疫检测领域, 不同类型信号增强方式也已广泛用于提高检测灵敏度, 如起源于上世纪的生物素-亲和素信号增强系统 (biotin-avidin-system, BAS), 凭借着生物素-亲和素的高亲和力牢固结合, 可使得相关免疫标记和示踪分析更加准确、灵敏, 该系统目前常用于

微量抗原和抗体的定性或定量检测 (Kendall *et al.* 1983)。

在采用信号增强策略提升真菌毒素检测灵敏度研究领域, 本课题组前期进行了相关探索。如建立的基于纳米金和辣根过氧化物酶双标记抗体的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 检测方法, 通过将纳米金作为载体, 多个 Anti AFB<sub>1</sub>-HRP 与一个纳米金颗粒结合, 形成的类似多聚的 HRP 复合物使检测信号大幅增强 (章先等 2018); 此外建立的基于纳米磁珠和双标记抗体的玉米赤霉烯酮检测方法, 以纳米磁珠为载体固定偶联抗原, 并使用金颗粒和辣根过氧化物酶双标记抗体催化底物, 进行信号检测, 在实现提升检测灵敏度的同时, 满足了高通量的检测需求 (肖佳丽等 2019)。本研究拟基于上述研究结果, 通过采用纳米磁珠制备磁珠-单克隆抗体复合物, 并结合生物素-亲和素系统和纳米金标记两种信号增强策略, 即使用辣根过氧化物酶-链霉亲和素 (Strep-HRP) 标记纳米金颗粒 (Strep-HRP-AuNPs) 催化底物进行信号检测, 以最终实现农产品和饲料中 OTA 的快速、高灵敏度定量检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂:** 赭曲霉毒素 A (OTA) 以及其他常见菌毒素标准品、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 购自 Sigma 公司; 辣根过氧化物标记的链霉亲和素 (Strep-HRP) 购自 Anaspec 公司; 羧基修饰的纳米磁珠 M270 (15305D)、生物素标记试剂盒 (21435) 和 Zeba<sup>TM</sup> 脱盐柱购自 Thermo Fisher Scientific; OTA 单克隆抗体 (Anti-OTA)、OTA 偶联抗原 (OTA-BSA) 和辣根过氧化物酶标记的 OTA (OTA-HRP) 均为本实验室前期制备; 其他相关试剂购自于国药集团化学试剂有限公司; 谷物阴性和天然样本由浙江省检验检疫科学技术研究院提供。

**1.1.2 主要仪器:** 酶标仪 SpectraMax M2 购自美

国 Molecular Device 公司, 96 孔板水平快速振荡器 (QB-9001) 购自海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 高速离心机 (D-37520) 购自 Thermo 公司; EP 管磁力架 (MS-12) 购自美国 Bangs Laboratories 公司; 96 孔板配套磁性底座为浙江大学动物预防医学研究所研制。

## 1.2 纳米磁珠-单克隆抗体复合物 (MNPs-Anti OTA) 的制备

纳米磁珠表面羧基活化后可与抗体的氨基经缩合作用形成稳定的共价键, 本研究正是利用该原理制备纳米磁珠-单克隆抗体复合物 (MNPs-Anti OTA)。

操作步骤如下: 羧基修饰的纳米磁珠贮存液充分振荡后, 取 100 $\mu$ L (30mg/mL) 于 EP 管中, 经磁力架磁性分离, 弃去上清, 加入等体积 25mmol/L MES 缓冲液 (pH 5), 重悬混匀, 再经磁性分离, 弃去上清, 重复上述步骤 3 次, 洗涤磁珠; 加入 50mg/mL EDC 和 NHS 溶液各 50 $\mu$ L 于磁珠中, 室温重悬振荡 30min, 活化羧基; 完成后, 按照上述操作洗涤磁珠; 加入 100 $\mu$ L 25mmol/L MES 缓冲液 (pH 5.0) 配置的浓度为 0.7mg/mL Anti-OTA 抗体溶液至已活化的磁珠中, 室温振荡反应 2h, 反应结束后洗涤磁珠; 最后加入 100 $\mu$ L 50mmol/L Tris 溶液 (pH 7.4) 室温振荡反应 20min, 淬灭未反应的羧基; 所得产物收集后重悬于 100 $\mu$ L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 中, ELISA 鉴定后, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

## 1.3 生物素标记 OTA 偶联抗原 OTA-BSA-Bio 的制备与鉴定

制备生物素标记大分子时, 生物素摩尔数一般应为待标记分子的 20 倍左右, 本研究中待标记分子为 3mg 的 OTA 偶联抗原 OTA-BSA (2mg/mL), 经计算, 生物素 (Sulfo-NHS-LC-Biotin) 用量约为 137 $\mu$ L (3.7mg/mL)。标记步骤如下所述: OTA-BSA 浓度 2mg/mL, 体积 1.5mL (溶剂为磷酸盐缓冲液, PBS); 称取 2.2mg Sulfo-NHS-LC-Biotin 溶于 600 $\mu$ L 超纯水, 取 137 $\mu$ L 配置的生物素溶液加入

待标记的偶联抗原中, 上下颠倒充分混匀, 室温反应 2h; 反应结束后, 产物经 Zeba<sup>TM</sup> 脱盐柱 1 000 $\times$ g 离心 2min, 并重复上柱 2-3 次, 以去除体系中未反应的生物素分子, 收集最终的标记产物。

首先通过 HABA 法 (Landar *et al.* 2006; Yellepeddi *et al.* 2009) 计算上述标记产物 OTA-BSA-Bio 的标记摩尔比 (OTA-BSA: Biotin), 步骤如下:

(1) 取 10mg 生物素和 600 $\mu$ L 浓度为 10mmol/L 的 HABA 溶液至于 19.4mL PBS, 充分混匀后取 180 $\mu$ L 于 96 孔板中, 测 500nm 处吸光度, 记为  $A_{500}/\text{HABA}/\text{Avidin}$ ; (2) 取 20 $\mu$ L OTA-BSA-Bio 加入上述孔, 混匀后测 500nm 处吸光度, 记为  $A_{500}/\text{HABA}/\text{Avidin}/\text{Biotin}$ ; (3) 按说明书公式, 根据  $A_{500}/\text{HABA}/\text{Avidin}$  与  $A_{500}/\text{HABA}/\text{Avidin}/\text{Biotin}$  数值, 计算出标记摩尔比。

后续采用 ELISA 对 OTA-BSA-Bio 进行免疫学鉴定。OTA 单克隆抗体包被于 ELISA 板 (0.5 $\mu$ g/孔), 依次加入 OTA-BSA-Bio 和 Strep-HRP 进行作用, 同时设置 OTA-BSA 作为对照。

## 1.4 纳米金-辣根过氧化物酶-链酶亲和素标记物 (Strep-HRP-AuNPs) 的制备

纳米金 (20nm) 的制备和鉴定参考 Zhang *et al.* (2018a) 的方法。

取 20mL 纳米金溶液, 调 pH 至 8.0 (使用 0.2mol/L  $\text{K}_2\text{CO}_3$  溶液); 缓慢逐滴加入 2.5mL 溶于 2mmol/L 硼酸盐缓冲液 (BB, pH 7.4) 的辣根过氧化物酶-链酶亲和素溶液 (Strep-HRP, 0.1mg/mL), 室温混匀反应 30min; 随后加入 10mL 溶解于硼酸盐缓冲液 (BB, pH 7.4) 的牛血清白蛋白 (BSA, 10%) 溶液, 室温磁力搅拌反应 30min; 为除去未标记的 Strep-HRP, 提高产物的均一度, 标记产物先经 2 500 $\times$ g 离心 30min 后弃沉淀, 再经 8 000 $\times$ g 离心 40min, 弃上清; 用硼酸盐缓冲液 (2mmol/L, pH 7.4) 重悬沉淀, 并将体积恢复至 20mL; 最后经 6 000 $\times$ g 离心 30min 弃上清, 重复 3 次后, 5mL PBS 缓

冲液（10mmol/L）重悬标记产物置于 4℃ 保存备用。

### 1.5 基于纳米颗粒和生物素-亲和素系统检测 OTA 方法（MNPs-bs-AuNPs-ELISA）的建立

检测原理见图 1。该方法基于酶联免疫原理，将 OTA 单克隆抗体包被至纳米磁珠表面以制备纳米磁珠-抗体复合物（MNPs-Anti OTA），纳米磁珠赋予抗体的流动性及富集作用使得竞争反应更加充分，同时使用辣根过氧化物酶-链酶亲和素（Strep-HRP）标记纳米金颗粒（Strep-HRP-AuNPs）进行催化显色，两种信号增强策略（生物素-亲和素系统和链酶亲和素-辣根过氧化物酶标记纳米金）的共同使用将大幅提升检测信号，实现 OTA 的快速高灵敏检测。

检测步骤如下：（1）取稀释后的磁珠-OTA 抗体复合物（MNPs-Anti OTA）置于 96 孔板中（10μL/孔），并设置 3 个平行，250μL 梯度稀释的 OTA 标准品与 250μL 生物素标记的 OTA 偶联抗原（OTA-BSA-Bio）等体积混匀后加入各反应孔中（150μL/孔），37℃ 作用 45min 后，利

用配套磁性底座富集、洗涤磁珠，洗涤缓冲液为 10mmol/L PBS（200μL/孔）；（2）每孔加入 150μL 辣根过氧化物酶-链酶亲和素标记纳米金颗粒（Strep-HRP-AuNPs），37℃ 水平混匀反应 15min 后，富集和洗涤磁珠；（3）加入 TMB 底物（100μL/孔），37℃ 反应 5min 后 2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应（50μL/孔），酶标仪读取 OD<sub>450</sub>。

在 MNPs-bs-AuNPs-ELISA 模式下，磁珠抗体复合物 MNPs-Anti OTA 的过量会造成背景值偏高，导致检测灵敏度降低。

采用棋盘阵法对各反应组分进行优化（Jiang *et al.* 2012）。MNPs-Anti OTA 稀释倍数依次为 1:50、1:100、1:200 和 1:400；OTA-BSA-Bio 从 0.02μg/mL 开始，倍比稀释 6 个梯度；辣根过氧化物酶-链酶亲和素标记纳米金颗粒（Strep-HRP-AuNPs，0.5mg/mL）的稀释倍数依次为 1:500、1:1 000、1:2 000、1:4 000 和 1:8 000。

为确定各组分最佳浓度后优化竞争反应时间，设置竞争时间依次为 15、30、45 和 60min，各竞争反应加入等量竞争抗原，分别计算抑制率。

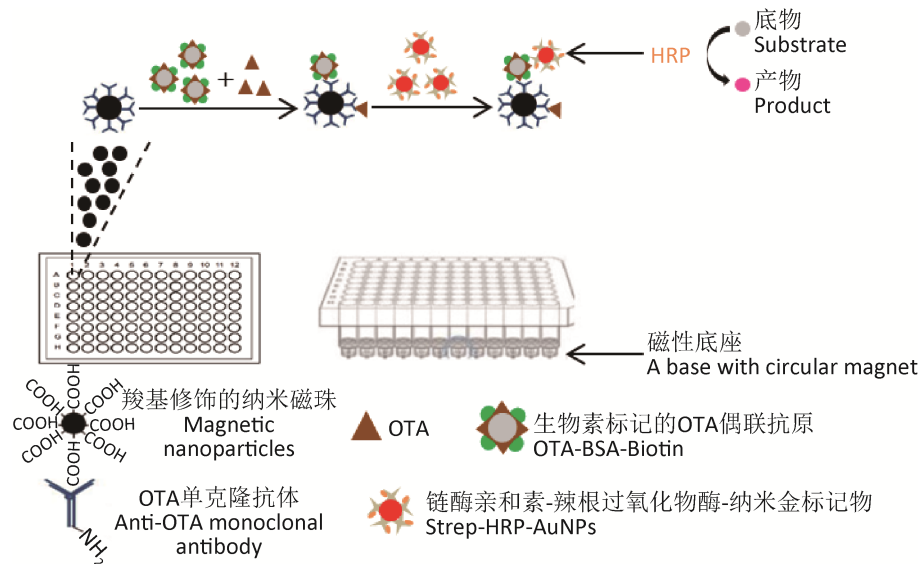


图 1 基于纳米颗粒和生物素-亲和素系统的赭曲霉毒素 A 检测方法示意图

Fig. 1 Schematic presentation of MNPs-bs-AuNPs-ELISA for the detection of ochratoxin A.

OTA 标准品浓度梯度区间为 7.8–0.015ng/mL (倍比稀释), 阴性对照为: 标准品稀释液和含 0.05%脱脂奶粉的 PBST 等体积混合液, 空白对照为: Strep-HRP-AuNPs 和标准品稀释液等体积混合液, 每个浓度梯度共设置 3 个平行。以 OTA 浓度对数为横坐标、抑制率为纵坐标, 构建 MNPs-bs-AuNPs-ELISA 标准曲线, 并求得相关参数。

### 1.6 MNPs-bs-AuNPs-ELISA 检测法特异性分析

选择 OTA 结构类似物和其他常见真菌毒素, 包括有 OTB、OTC、黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)、玉米赤霉烯酮 (ZEN)、伏马毒素 (FB<sub>1</sub>)、呕吐毒素 (DON)、桔青霉素 (CIT) 和展青霉毒素 (PAT) 分别作为竞争抗原, 测量 IC<sub>50</sub> 值, 并按下式计算交叉反应率 (孙清等 2015):

$$\text{交叉反应率(\%)} = (\text{ZEN IC}_{50}) / (\text{类似物 IC}_{50}) \times 100\%$$

### 1.7 样本基质影响的消除

样本检测时, 需进行萃取, 萃取剂中高浓度的有机试剂 (OTA 的萃取通常使用甲醇-水溶液) 以及样本中富含的蛋白质和纤维素等均会对抗原-抗体间的特异性反应造成影响, 即基质效应。为确保检测结果的准确性, 通常采用超纯水对萃取液进行稀释, 以降低基质效应。

为避免稀释倍数过高, 降低了检测灵敏度, 本研究分别选取不同类型阴性样本 (玉米、面粉和大豆) 萃取液, 并经超纯水系列梯度稀释后 (1:1、1:3、1:7) 制备 OTA 标准品溶液, 通过绘制基质添加标准曲线, 优化稀释倍数, 使得基质影响消除的同时, 获得最佳检测灵敏度。

### 1.8 样本萃取与加标试验

5g 样本置于 50mL 离心管中, 加入 25mL 萃取液 (甲醇:水=7:3, V/V), 剧烈振荡 15min 后 5 000×g 离心 5min, 上清液过滤经超纯水稀释后进行检测。

根据检测范围, 确定加标浓度。加标步骤如下: 取经 LC-MS/MS 验证过的 OTA 阴性样本, 充分研磨过筛后置于 60℃烘箱干燥, 加入 OTA 标准溶液, 混匀后放置过夜待检。不同加标样本设

置 3 个平行, 且不同时间重复测定 3 次。

### 1.9 纳米颗粒和生物素-亲和素系统检测法 (MNPs-bs-AuNPs-ELISA) 与 LC-MS/MS 比较试验

对天然样本 (玉米、小麦和饲料) 同时采用 MNPs-bs-AuNPs-ELISA 和 LC-MS/MS 进行平行检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 纳米磁珠-单克隆抗体复合物 (MNPs-Anti OTA) 的制备

取等量纳米磁珠 (MNPs)、纳米磁珠-OTA 单克隆抗体复合物 (MNPs-Anti OTA) 以及纳米磁珠-AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体复合物 (MNPs-Anti AFB<sub>1</sub>), 使用辣根过氧化物酶标记的 OTA (OTA-HRP) 进行 ELISA 鉴定, 操作流程参考 1.5。标记产物 MNPs-Anti OTA 组的 OD<sub>450</sub> 与对照 MNPs 和 MNPs-Anti AFB<sub>1</sub> 组的比值远大于 2.1 (图 2), 表明已成功制备具有抗体活性的免疫磁珠 MNPs-Anti OTA。

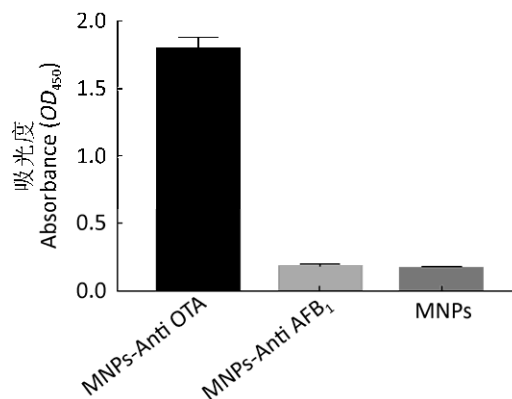


图 2 纳米磁珠-OTA 单克隆抗体复合物的 ELISA 鉴定

Fig. 2 Identification of the OTA monoclonal antibody coated magnetic nanoparticles.

### 2.2 生物素标记偶联抗原 (OTA-BSA-Bio) 的鉴定

经 HABA 法计算出偶联抗原 (OTA-BSA-Bio) 中 OTA-BSA:Biotin 约为 4.9:1, 即每分子 OTA-BSA 上约标记有 4.9 分子的 Biotin; OTA-BSA-Bio 的 ELISA 鉴定结果见图 3, 相比未标记的 OTA-BSA 组, ZEN-BSA-Bio 可与 Strep-HRP 特异性结合。综上表明 OTA-BSA-Bio 制备成功, 为后续建立免疫学检测方法奠定基础。

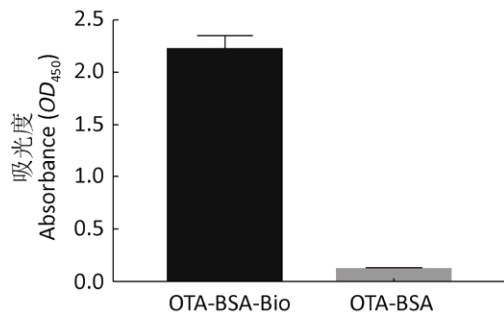


图3 直接ELISA对生物素标记抗原OTA-BSA-Bio的鉴定  
Fig. 3 Identification of biotinylated ochratoxin A-bovine serum albumin (ZEN-BSA-Bio) by direct ELISA.

### 2.3 MNPs-bs-AuNPs-ELISA 各组分作用浓度和竞争孵育时间的确定

方阵滴定法确定MNPs-Anti OTA的稀释倍数为1:200, OTA-BSA-Bio和Strep-HRP-AuNPs作用浓度分别为0.005和0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。竞争孵育时间优化结果见图4, 综合反应时间和灵敏度, 确定为45min。

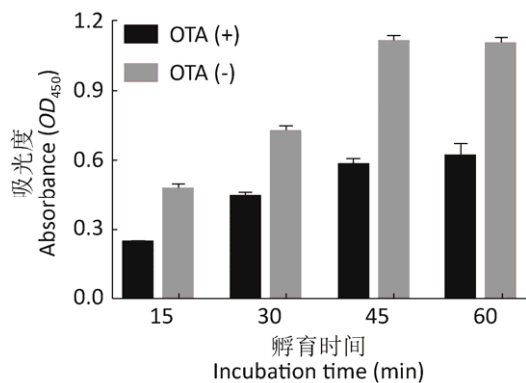


图4 不同竞争反应时间对MNPs-bs-AuNPs-ELISA检测效果的影响

Fig. 4 Determination of suitable incubation time by MNPs-bs-AuNPs-ELISA with (+OTA) or without (-OTA) addition of ochratoxin A.

### 2.4 基于纳米颗粒和生物素-亲和素系统的MNPs-bs-AuNPs-ELISA检测OTA方法的建立

经优化, MNPs-bs-AuNPs-ELISA最佳反应条件为: MNPs-Anti OTA的稀释倍数为1:200; OTA-BSA-Bio和Strep-HRP-AuNPs作用浓度分别为0.005和0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 竞争时间为45min。

以竞争抗原OTA标准品浓度对数为横坐标, 以抑制率为纵坐标, 通过GraphPad Prism 7软件绘制抑制曲线(图5)。线性方程为 $y=0.4011x+0.8557$ ( $R^2=0.9935$ ), 线性范围为0.02–0.73ng/mL, 检测下限为0.01ng/mL, 半数抑制率( $IC_{50}$ )为0.13ng/mL。

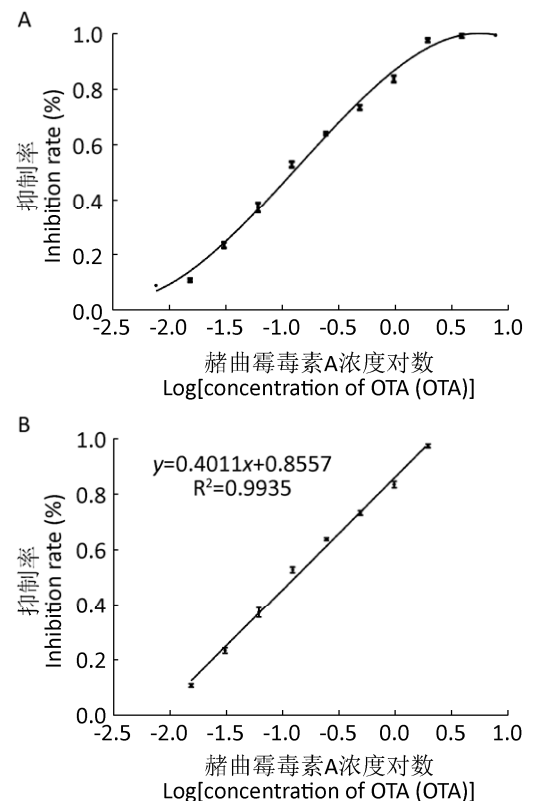


图5 基于纳米颗粒和生物素-亲和素系统的OTA检测方法竞争抑制曲线(A)和抑制率线性分析(B)

Fig. 5 Competitive inhibition of ZEN in MNPs-bs-AuNPs-ELISA (A) and linear analysis of percent inhibition against OTA concentration (B).

前期研究中, 基于该抗体建立的常规间接竞争ELISA( $IC_{10}$ )检测下限( $IC_{10}$ )为0.07ng/mL, 半数抑制率( $IC_{50}$ )为0.38ng/mL, 检测时长约2h (Zhang *et al.* 2015); 本研究建立的基于磁珠抗体复合物和两种信号增强策略(生物素-亲和素系统和纳米金标记)的检测法(MNPs-bs-AuNPs-ELISA)在缩短检测时间的同时(1h), 灵敏度更高, 检测下限( $IC_{10}$ )为0.01ng/mL, 半数抑制

率 ( $IC_{50}$ ) 为 0.13ng/mL。

## 2.5 基于纳米颗粒和生物素-亲和素系统的 MNPs-bs-AuNPs-ELISA 检测 OTA 特异性分析

特异性分析结果见表 1, 建立的 MNPs-bs-AuNPs-ELISA 对 OTA 类似物 OTB、OTC 交叉反应性低且对其他常见真菌毒素基本无交叉反应, 表明该方法特异性高。

## 2.6 基质效应的消除

本研究建立的 MNPs-bs-AuNPs-ELISA 法基质效应分析结果表明, 选取的 3 种不同样本的基质效应 (玉米、面粉和大豆) 均在经超纯水 1:3 倍稀释后消除, 即此时的基质添加标准曲线与标准抑制曲线 (PBS 稀释) 基本一致, 故在后续样本前处理时, 萃取液经 1:3 倍稀释后即可进行检

测 (图 6)。

表 1 MNPs-bs-AuNPs-ELISA 检测 OTA 特异性分析

Table 1 Cross-reactivity of MNPs-bs-AuNPs-ELISA to other mycotoxins

竞争物	半数抑制率	交叉反应率
Analyte	$IC_{50}$ (ng/mL)	Cross-reactivity (%)
Ochratoxin A	0.13	100
Ochratoxin B	3.02	4.3
Ochratoxin C	1.61	8.1
Aflatoxin B <sub>1</sub>	$>2 \times 10^3$	<0.006
Zearalenone	$>2 \times 10^3$	<0.006
Fumonisin B <sub>1</sub>	$>2 \times 10^3$	<0.006
Deoxynivalenol	$>2 \times 10^3$	<0.006
Citrinin	$>2 \times 10^3$	<0.006
Patulin	$>2 \times 10^3$	<0.006

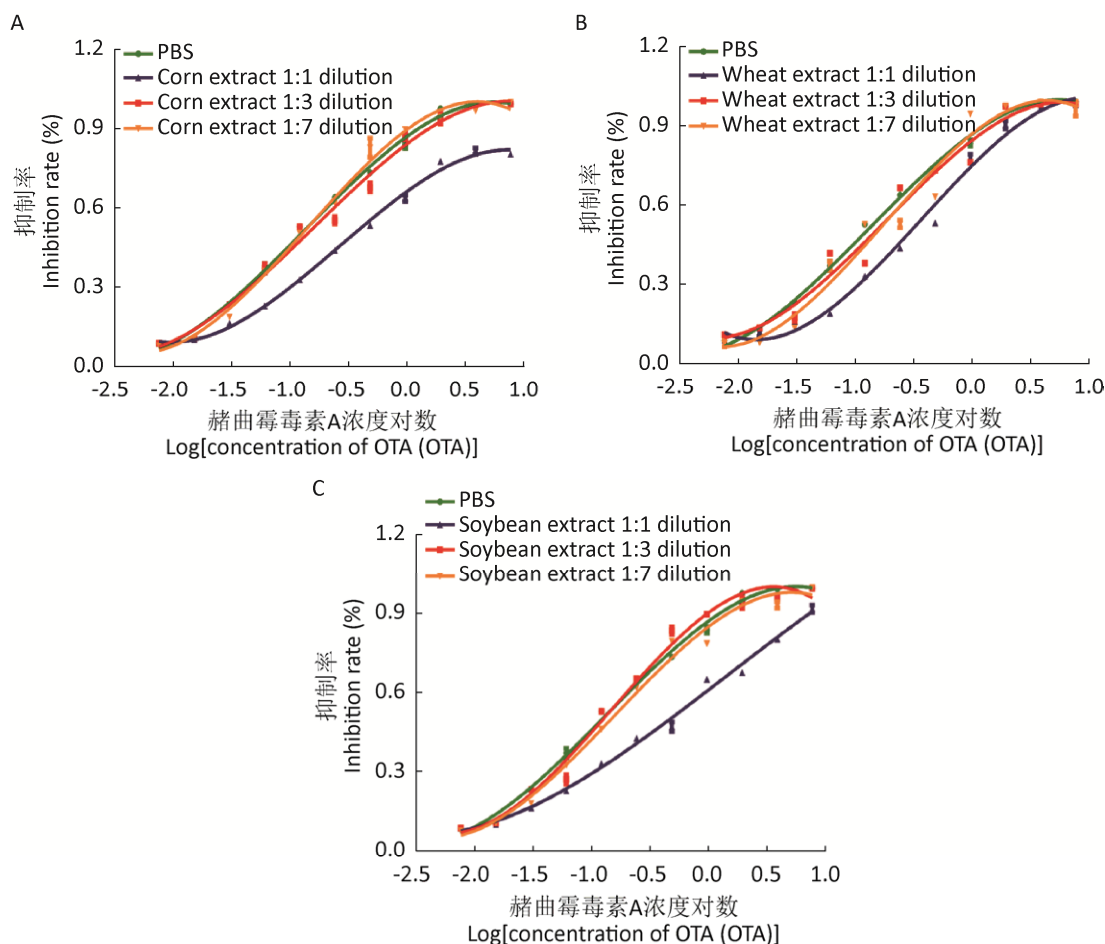


图 6 不同样本萃取液基质影响消除试验

Fig. 6 Matrix interferences of extracts from corn (A), wheat (B) and soybean (C) spiked with ochratoxin A and diluted in different ratios with phosphate buffered saline as measured by MNPs-bs-AuNPs-ELISA.



### 2.7 加标回收试验

按照 1.8 中所述, 取 3 种样本 (由浙江省检验检疫科学技术研究院提供, 经 LC-MS/MS 验证为 OTA 阴性的玉米、小麦和大豆) 进行加标试验。

根据 MNPs-bs-AuNPs-ELISA 的检测区间, 设置 OTA 的加标浓度依次为 1.25、2.5、5 和 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。各浓度 3 个平行, 且重复测定 3 次, 分别计算相关参数。

结果表明, 本研究建立的 MNPs-bs-AuNPs-ELISA 加标回收率在 85.6%–115.7%之间, 批间相对标准差为 6.5%–9.6% (表 2), 上述结果表明该检测方法准确率高且稳定性好, 具有一定的实用性和可靠性。

表 2 样本的加标回收率和批间相对标准差

Table 2 Recovery and relative standard deviations of samples spiked with different levels of ochratoxin A by MNPs-bs-AuNPs-ELISA

Sample	OTA 浓度		批间 RSD (%)	回收率 rate (%)
	Concentration of OTA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )			
	加标 Spiked	检出 Detected, Mean $\pm$ SD		
玉米 Corn	1.25	1.07 $\pm$ 0.05	6.5	85.6
	2.5	2.26 $\pm$ 0.13	7.7	90.4
	5	4.31 $\pm$ 0.29	7.3	86.2
	10	10.39 $\pm$ 0.75	9.6	103.9
小麦 Wheat	1.25	1.41 $\pm$ 0.09	8.5	112.8
	2.5	2.34 $\pm$ 0.14	7.5	93.6
	5	5.32 $\pm$ 0.44	9.4	106.4
大豆 Soybean	1.25	1.37 $\pm$ 0.07	6.6	109.6
	2.5	2.83 $\pm$ 0.13	7.1	113.2
	5	4.46 $\pm$ 0.37	9.3	89.2
	10	9.38 $\pm$ 0.59	8.2	93.8

### 2.8 新型酶联免疫检测法 (MNPs-bs-AuNPs-ELISA) 与 LC-MS/MS 相关性分析

采用 MNPs-bs-AuNPs-ELISA 和 LC-MS/MS 对 19 份天然阳性样本中 (浙江省检验检疫科学技术研究院提供) OTA 进行检测 (表 3), 相关性分析结果见图 7, 线性回归方程为: LC-MS/MS=

表 3 自建 MNPs-bs-AuNPs-ELISA 和 LC-MS/MS 对天然样本中 OTA 的定量检测结果

Table 3 Quantitative detection of OTA in natural samples by the developed MNPs-bs-AuNPs-ELISA and LC-MS/MS

Sample No.	新型酶联免疫检测法 MNPs-bs-AuNPs-ELISA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), Mean $\pm$ SD	液相二级质谱 LC-MS/MS ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), Mean $\pm$ SD
1	13.85 $\pm$ 1.19	16.62 $\pm$ 1.35
2	15.03 $\pm$ 1.41	19.28 $\pm$ 1.26
3	18.32 $\pm$ 1.72	22.94 $\pm$ 1.32
4	27.19 $\pm$ 2.35	25.57 $\pm$ 2.71
5	2.15 $\pm$ 0.16	3.98 $\pm$ 0.73
6	18.65 $\pm$ 1.67	15.97 $\pm$ 1.41
7	21.93 $\pm$ 1.98	18.39 $\pm$ 1.03
8	16.32 $\pm$ 1.53	20.01 $\pm$ 1.61
9	2.16 $\pm$ 0.17	1.36 $\pm$ 0.12
10	22.37 $\pm$ 2.03	27.71 $\pm$ 2.13
11	15.41 $\pm$ 1.35	20.99 $\pm$ 2.71
12	2.93 $\pm$ 0.23	4.18 $\pm$ 0.31
13	18.65 $\pm$ 2.07	25.57 $\pm$ 2.32
14	23.76 $\pm$ 2.19	20.41 $\pm$ 0.17
15	37.83 $\pm$ 0.27	45.62 $\pm$ 3.12
16	1.67 $\pm$ 0.15	1.23 $\pm$ 0.11
17	27.35 $\pm$ 1.29	32.36 $\pm$ 2.14
18	30.92 $\pm$ 2.83	26.71 $\pm$ 2.13
19	17.63 $\pm$ 1.19	14.87 $\pm$ 1.21

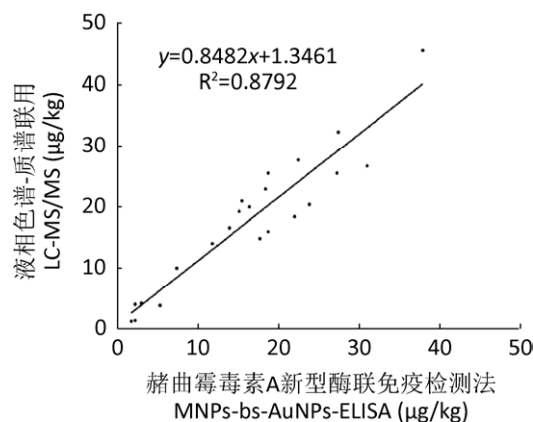


图 7 MNPs-bs-AuNPs-ELISA 与 LC-MS/MS 检测结果的相关性分析

Fig. 7 Correlation of results obtained by MNPs-bs-AuNPs-ELISA and LC-MS/MS for OTA detection in natural samples.

0.8482 MNPs-bs-AuNPs-ELISA-1.3641 ( $R^2=0.8792$ ), 表明本研究建立的方法与 LC-MS/MS 相关性较好, 可满足实际样本中 OTA 的定量检测需求。

### 3 讨论

赭曲霉毒素 A (OTA) 广泛污染谷物及其制品和动物饲料, 可对人类和动物肾脏造成严重损伤, 并抑制免疫系统, 毒性和危害性仅次于 AFB<sub>1</sub> (Li *et al.* 2019)。基于单克隆抗体的酶联免疫检测法 (ELISA) 由于准确性高、特异性好且操作简单, 已被广泛应用于 OTA 的快速筛查和检测 (Sun *et al.* 2019)。本研究在前期工作的基础上, 将 OTA 单克隆抗体包被于纳米磁珠表面制备磁珠-抗体复合物, 并同时结合使用两种信号增强策略, 经优化相关反应条件, 最终成功制备了基于纳米颗粒和生物素-亲和素信号系统的 OTA 新型高灵敏酶联免疫检测方法 (MNPs-bs-AuNPs-ELISA), 实现了 OTA 的快速、高灵敏度检测。

纳米磁珠具有超顺磁性, 已广泛应用于免疫学检测方法的建立 (Wang *et al.* 2016); 生物素-亲和素系统中每分子亲和素可特异性、高亲和力牢固结合 4 分子生物素, 基于该策略构建的多层次信号放大系统可使相关免疫标记与示踪分析更加灵敏, 较为常用 (Wang *et al.* 2013); 金颗粒生物相容性好, 制备便捷且成本低, 已有众多研究将其作为固相载体, 用于提高检测灵敏度 (Rezaei *et al.* 2011; Zhou *et al.* 2014; Razo *et al.* 2018)。

在本研究中, 磁珠抗体复合物的使用使竞争反应在液相环境中进行, 反应更加充分, 耗时更短; 链酶亲和素-辣根过氧化物酶标记金颗粒后, 一个金颗粒表面将固定多个辣根过氧化物酶, 随着生物素标记抗原的使用, 当生物素结合某一链酶亲和素-辣根过氧化物酶后, 金颗粒的存在使得催化底物的酶数量成倍增加, 检测信号大幅提高。与基于相同抗体的间接竞争 ELISA (IC-ELISA) (Zhang *et al.* 2015) 相比, 该 MNPs-bs-AuNPs-ELISA

缩短了检测时间, 降低了检测下限。3 种信号增强策略的结合使用, 与其他采用单一信号增强策略如纳米抗体、纳米铜粉、银纳米粒子等建立的 OTA 检测方法相比 (Jiang *et al.* 2017; Liu *et al.* 2017; Song *et al.* 2018), 同样具有优势。

本研究建立的 OTA 新型高灵敏酶联免疫检测法方便快捷, 无需复杂仪器设备支持, 能够用于实际样品中 OTA 的快速定量检测与分析, 目前尚未发现有过相关报道。此外, 该方法成本低、相关成分易储存, 可在乡镇质监检测机构、饲料生产企业和动物养殖企业的检测实验室等基层单位推广使用, 应用前景较好。

### [REFERENCES]

- Brennan KM, Oh SY, Yiannikouris A, Graugnard DE, Karrow NA, 2017. Differential gene expression analysis of bovine macrophages after exposure to the *Penicillium* mycotoxins citrinin and/or ochratoxin A. *Toxins* (Basel), 9(11): 366
- Jiang H, Li XM, Xiong Y, Pei K, Nie LJ, Xiong YH, 2017. Silver nanoparticle-based fluorescence-quenching lateral flow immunoassay for sensitive detection of ochratoxin a in grape juice and wine. *Toxins*, 9(3): 83
- Jiang WX, Luo PJ, Wang X, Chen X, Zhao YF, Shi W, Wu XP, Wu YN, Shen JZ, 2012. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of nitrofurantoin metabolite, 1-amino-hydantoin, in animal tissues. *Food Control*, 23(1): 20-25
- Kendall C, Ionescu-Matiu I, Dreesman GR, 1983. Utilization of the biotin/avidin system to amplify the sensitivity of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of Immunological Methods*, 56(3): 329-339
- Landar A, Oh JY, Giles NM, Isom A, Kirk M, Barnes S, Darley-Usmar VM, 2006. A sensitive method for the quantitative measurement of protein thiol modification in response to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(3): 459-468
- Li C, Chen WY, Zheng LR, Zhang BY, Yang XQ, Zhang QP, Wang N, Wang Y, Yang JYQ, Sha JZ, Zhou Z, Li XH, Li YZ, Shen XL, 2019. Ameliorative effect of ursolic acid on ochratoxin A-induced renal cytotoxicity mediated by Lonp1/Aco2/Hsp75. *Toxicon*, 168: 141-146
- Liu X, Tang ZW, Duan ZH, He ZY, Shu M, Wang XX, Gee SJ, Hammock BD, Xu Y, 2017. Nanobody-based enzyme

- immunoassay for ochratoxin A in cereal with high resistance to matrix interference. *Talanta*, 164: 154-158
- Razo SC, Panferov VG, Safenkova IV, Varitsev YA, Zherdev AV, Dzantiev BB, 2018. Double-enhanced lateral flow immunoassay for potato virus x based on a combination of magnetic and gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, 1007: 50-60
- Rezaei B, Majidi N, Rahmani H, Khayamian T, 2011. Electrochemical impedimetric immunosensor for insulin like growth factor-1 using specific monoclonal antibody-nanogold modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5): 2130-2134
- Song CX, Hong WW, Zhang XY, Lu Y, 2018. Label-free and sensitive detection of ochratoxin A based on dsDNA-templated copper nanoparticles and exonuclease-catalyzed target recycling amplification. *Analyst*, 143: 1829-1834
- Sorrenti V, di Giacomo C, Acquaviva R, Barbagallo I, Bognanno M, Galvano F, 2013. Toxicity of ochratoxin a and its modulation by antioxidants: a review. *Toxins (Basel)*, 5(10): 1742-1766
- Sun Q, Li GF, Deng QM, Liu JM, Shi GQ, 2015. Development and application of a highly sensitive ELISA kit for aflatoxin B<sub>1</sub>. *Environmental Chemistry*, 34(10): 1845-1853 (in Chinese)
- Sun ZC, Wang XR, Tang ZW, Chen Q, Liu X, 2019. Development of a biotin-streptavidin-amplified nanobody-based ELISA for ochratoxin A in cereal. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 171: 382-388
- Wang CQ, Qian J, Wang K, Yang XW, Liu Q, Hao N, Wang CK, Dong XY, Huang XY, 2016. Colorimetric aptasensing of ochratoxin a using Au@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as signal indicator and magnetic separator. *Biosensors and Bioelectronics*, 77: 1183-1191
- Wang YK, Yan YX, Ji WH, Wang HA, Zou Q, Sun JH, 2013. Novel chemiluminescence immunoassay for the determination of zearalenone in food samples using gold nanoparticles labeled with streptavidin-horseradish peroxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(18): 4250-4256
- Xiao JL, Ye Q, Fang Y, Fang WH, Song HH, Zhang X, 2019. Efficient detection of zearalenone by using magnetic-nanoparticle and double-labeled monoclonal antibody complex. *Mycosystema*, 38(3): 440-450 (in Chinese)
- Yellepeddi VK, Kumar A, Palakurthi S, 2009. Biotinylated poly (amido) amine (pamam) dendrimers as carriers for drug delivery to ovarian cancer cells *in vitro*. *Anticancer Research*, 29(8): 2933-2943
- Zhang X, 2016. Immunoassays for detection of four major mycotoxins in agro-products. PhD Dissertation, Zhejiang University, Hangzhou. 16 (in Chinese)
- Zhang X, Fang Y, Fu ZX, Zhou YZ, Fang WH, Song HH, 2018. An efficient method for aflatoxin B<sub>1</sub> detection based on gold nanoparticles labeled with monoclonal antibody-horseradish peroxidase complex. *Mycosystema*, 37(11): 1516-1524 (in Chinese)
- Zhang X, He K, Fang Y, Cao T, Paudyal N, Zhang XF, Song HH, Li XL, Fang WH, 2018a. Dual flow immunochromatographic assay for rapid and simultaneous quantitative detection of ochratoxin a and zearalenone in corn, wheat, and feed samples. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 19(11): 871-883
- Zhang X, Sun MJ, Kang Y, Xie H, Wang X, Song HH, Li XX, Fang WH, 2015. Identification of a high-affinity monoclonal antibody against ochratoxin a and its application in enzyme-linked immunosorbent assay. *Toxicon*, 106: 89-96
- Zhang X, Wang Z, Fang Y, Sun RJ, Cao T, Paudyal N, Fang WH, Song HH, 2018b. Antibody microarray immunoassay for simultaneous quantification of multiple mycotoxins in corn samples. *Toxins (Basel)*, 10(10): Doi: 10.3390/toxins10100415
- Zheng MZ, Richard JL, Johann B, 2006. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia*, 161(5): 261-273
- Zhou J, Du LP, Zou L, Zou YC, Hu N, Wang P, 2014. An ultrasensitive electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen detection based on staphylococcal protein a—au nanoparticle modified gold electrode. *Sensors & Actuators B Chemical*, 197(7): 220-227

## [附中文参考文献]

- 孙清, 李谷丰, 邓乾民, 刘杰民, 时国庆, 2015. 高灵敏黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 酶联免疫试剂盒的研制及应用. *环境化学*, 34(10): 1845-1853
- 肖佳丽, 叶青, 方云, 方维焕, 宋厚辉, 章先, 2019. 基于纳米磁珠和双标记抗体的玉米赤霉烯酮快速、高灵敏检测方法的建立及应用. *菌物学报*, 38(3): 440-450
- 章先, 2006. 农产品中四种常见真菌毒素免疫检测技术研究. 浙江大学博士论文, 杭州. 16
- 章先, 方云, 付子贤, 周一钊, 方维焕, 宋厚辉, 2018. 基于纳米金和辣根过氧化物酶双标记抗体的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 高灵敏检测方法的建立及应用. *菌物学报*, 37(11): 1516-1524

(本文责编: 王敏)